

不完全菌*Fusidium* sp. BX-1による油脂類の利用性

大 野 信 子、松 野 雅 子

1. 緒 言

土壌より分離した不完全菌*Fusidium* sp. BX-1は、多数の炭素源を利用して、広い範囲のpH（3～11）域で良好に生育することができる。特に、グリセロールを炭素源として含む培地においては、その細胞が酵母状になって生育し、デンプン分解酵素やキシラン分解酵素を良好に細胞外に生産する。本菌は、オリーブ油やオレイン酸の利用性にも優れているが、これらの炭素源を用いて培養した場合には、細胞は菌糸状となり、上記の糖質分解酵素をほとんど生産しなくなる^{1)~5)}。

微生物による油脂類の利用に関連した研究については、応用学的見地よりリパーゼの生産に関するものが中心であり、油脂類の利用に優れた微生物の生理化学に関する報告は比較的小さいようである。菌類に限ってみると、*Rhizopus delemar*、*Geotrichum candidum*、*Candida lipolytica*等のリパーゼの生産に関連した報告が代表的なものである^{6,7)}。

そこで、本報では、*Fusidium* sp. BX-1について油脂類の利用性とリパーゼの生産について他の酵母や菌類とも比較して検討を加えた。

2. 実験材料および方法

1) 使用菌株および保存法

使用菌株としては土壌より分離し、同定、保存されている不完全菌*Fusidium* sp. BX-1を用いた。本菌株は、前報に従ってプルラン斜面培地を用いて保存した¹⁾。

BX-1株の他に、研究室保存の以下の菌株も比較のために用いた。これら菌株は、常法に従い、YM斜面培地あるいはポテトデキストロース斜面培地を用いて保存した。

酵母類：*Debaryomyces hansenii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces rouxii*, *Saccharomyces rosei*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Lipomyces starkeyi*, *Hansenula*

anomala, *Candida utilis*, *Pichia membranaefaciens*, *Rhodotorula glutinis*

糸状菌類：*Aspergillus niger*, *Penicillium brasilianum*, *Rhizopus harachao*, *Lepista nuda*, *Coprinus cinereus*, *Mycena chlorophos*

2) 培地ならびに培養法

基本塩類培地には、蒸留水1ℓ中に、炭素源 20.0g、酵母エキス 5.0g、 KH_2PO_4 2.0g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0g、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1g、チアミン塩酸 0.2mgを含む組成のものを用了。

Fusidium sp. BX-1および酵母類は、100ml容三角フラスコに2%の炭素源を含む基本塩類培地を30ml入れたものに、これら菌株の各斜面培地よりそれぞれ1白金耳を取り接種し、28℃にて4日間回転(180rpm)振盪培養した。

菌類は、それぞれ菌株の斜面培養に殺菌水を10ml入れて調整した孢子懸濁液の各0.5mlを接種源として、上記の酵母類と同様にして培養した。

3) 生育度の測定法

Fusidium sp. BX-1および酵母類の生育は、培養液の610nmにおける吸光度を測定して求めた。その他の菌類については、培養液を濾過し、得られた菌体を105℃で乾燥したのち、重量を測定して求めた。

4) リパーゼ活性の測定法

リパーゼ活性の測定は、試薬類を以下のように調整して行った⁸⁾。

(a) 乳化剤溶液：乳化剤にはポリビニールアルコール(和光純薬、重合度1500)水溶液を用了。ポリビニールアルコールは20gを約800mlの水に懸濁し、攪拌しつつ加温し、完全に溶けるまで1時間約80℃に保ったのち放冷し、これに水を加えて1000mlとした。

(b) オリーブ油乳化液：オリーブ油(ナカライ、リパーゼ測定用)22.9gと上記乳化液75mlとをホモゲナイザーの容器に入れて十分冷却しておき、それを氷冷しつつ(10℃以下)激しく5分間のホモゲナイズ、5分間の休止、再び5分間のホモゲナイズにより乳化した。乳化後、5℃に1時間冷却放置したものを以下のように酵素反応の基質として用了。

(c) 酵素活性測定：オリーブ油乳化液5mlと0.1Mリン酸カリウム緩衝液(pH7.0)4mlとを50ml容三角フラスコに取り、よく混合し37℃にて10分間予熱したのち、酵素液1mlを攪拌しながら加えてインキュベートし反応を行った。20分後にアセトン-エタノール混液20mlを注ぎ、フェノールフタレイン試薬5滴を加え、0.05M水酸化ナトリウム溶液で滴定してオリーブ油からの滴定酸量を求めた。これとは別に同じ酵素液を用いて30分間インキュベートし、同様に滴定酸量を求めた。上記30分と20分の酸量の差を10分間の酵素反応による遊離酸量とし、

オレイン酸に換算して酵素活性を求めた。酵素活性の1単位は1分間に1 μ molのオレイン酸を遊離する酵素量とした。

3. 結果および考察

1) 各種酵母類によるオリーブ油の利用性

Fusidium sp. BX-1は、グリセロール培地上で細胞の形態が酵母状に、オリーブ油培地上で酵母状～短菌糸状となり、いずれも良好に生育する。そこで、まずBX-1株と各種の酵母を炭素源としてオリーブ油を2.0%含む培地で4日間培養し、生育度を比較した (Table 1)。

BX-1株と *H. anomala* は、オリーブ油培地において、ほぼ同程度の極めて良好な生育を示したが、調べられた他の酵母の生育は、著しく悪いか、ほとんど見られないものであった。酵母状に生育する菌類の多くは、油脂類の資化能が低いことが示唆され、酵母状に生育するBX-1株の油脂類の利用性は特異的であると考えられた。

2) 各種油脂類を利用した *Fusidium* sp. BX-1と *H. anomala* の生育

上記の2.0%オリーブ油培地において、BX-1株と同程度の生育を示した *H. anomala* について、さらに各種の油脂類、それぞれを2.0%含む培地を用いて、比較検討した (Table 2)。

両菌株は調べられた油脂類の全てをよく利用して生育した。BX-1株の生育は、ゴマ油培地を除いて若干ではあるが、*H. anomala* の生育と比較して、それより良好であった。

Table 1 Comparison of growth between *Fusidium* sp. BX-1 and various yeasts grown in a medium containing olive oil as a carbon source

Strains	Growth (O.D. 610 nm)	Final pH*
<i>Fusidium</i> sp. BX-1	57.0	5.5
<i>Hansenula anomala</i>	54.0	4.3
<i>Lipomyces starkeyi</i>	5.4	7.7
<i>Candida utilis</i>	3.8	7.5
<i>Rhodotorula glutinis</i>	3.6	8.0
<i>Debaryomyces hansenii</i>	3.4	6.6
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.4	7.2
<i>Pichia membranaefaciens</i>	1.6	5.6
<i>Saccharomyces rosei</i>	1.6	6.3
<i>Saccharomyces rouxii</i>	1.0	5.0
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	0.8	5.1

The organisms were incubated for 4 days.

* : Initial pH 5.0.

Table 2 Growth of *Fusidium* sp. BX-1 and *Hansenula anomala* on various oils

Oils	<i>Fusidium</i> sp. BX-1		<i>H. anomala</i>	
	Growth (O.D. 610nm)	Final pH*	Growth (O.D. 610nm)	Final pH*
Olive oil	57.6	5.6	53.0	4.3
Corn oil	60.4	5.7	52.1	4.1
Soybean oil	58.3	5.6	52.7	4.1
Sesame oil	50.5	5.5	55.4	4.1
Oleic acid	58.3	5.4	41.4	4.1
Glycerol	35.1	5.7	32.1	4.2

The organisms were incubated for 4 days.

* : Initial pH 5.0.

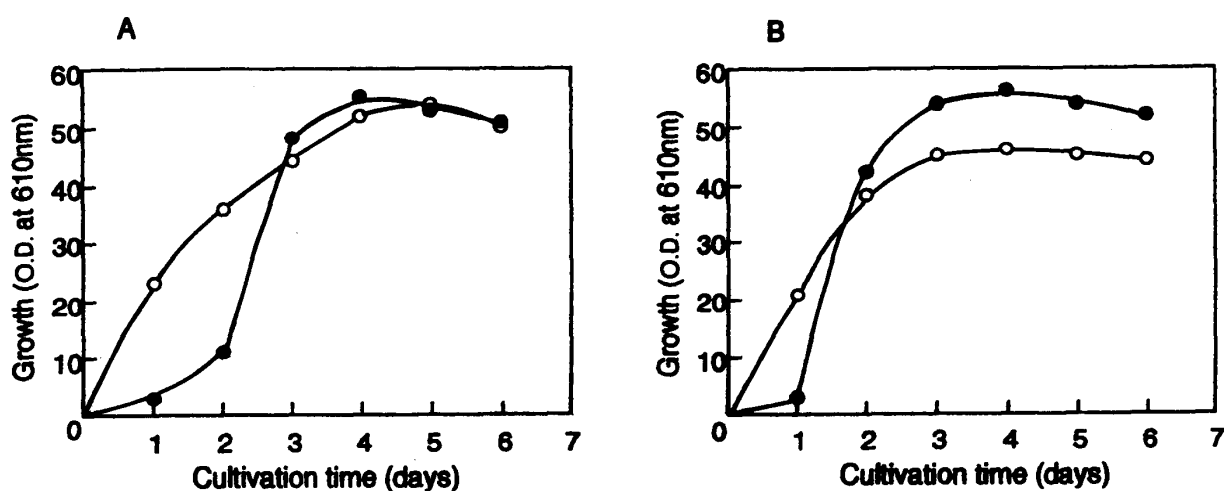


Fig. 1 Time course of cultures of *Fusidium* sp. BX-1 and *Hansenula anomala* in medium containing olive oil or oleic acid

Fusidium sp. BX-1 (A) and *Hansenula anomala* (B) were incubated in the basal salt medium containing olive oil (●) or oleic acid (○), respectively.

3) *Fusidium* sp. BX-1と*H. anomala*のオリーブ油培地とオレイン酸培地における生育経過

BX-1株と*H. anomala*のそれぞれ2%オリーブ油培地と2%オレイン酸培地における生育経過を調べた (Fig. 1)。

これらの培地における最大生育量は、いずれもBX-1株が若干大きい結果を示したものの、生育経過については、両菌株でほぼ同様な経過を示した。すなわち、オレイン酸培地におい

ては、両菌株は、接種後ほとんど誘導期なく生育が始まったものの、オリーブ油培地においては、*H. anomala* で約 1 日、BX-1 株で約 2 日間の誘導期ののちにいずれも旺盛な生育を始めた。この場合、両菌株のオリーブ油培地における生育速度はオレイン酸培地における生育速度よりいずれもかなり大きい結果を与えた。

以上の結果は、両菌株がオリーブ油の利用にあたり、その分解に必要とされるリパーゼ類の生合成に時間を要し、その必要とされる時間に両菌株間でかなりの差があること、しかし、オリーブ油が分解されれば、これら菌株がオレイン酸よりもよく利用できるグリセロールが生成されるため、いずれも急速な生育が始まることを示唆するものと考えている。

4) 各種糸状菌類によるオリーブ油とオレイン酸利用性

上記の 2 % オリーブ油培地とさらに 2 % オレイン酸培地に BX-1 株と不完全菌 (*A. niger*, *P. brasilianum*)、接合菌 (*R. harachao*)、担子菌 (*L. nuda*, *C. cinereus*, *M. chlorophos*) をそれぞれ接種し、4 日間培養後の生育度を比較した (Table 3)。

調べられた 7 菌株は、いずれもこれら両培地にほぼ同程度の良好な生育を示した。全体的に、オレイン酸よりもオリーブ油を炭素源として培養した場合にわずかではあるが生育度が高い傾向が見られた。

以上の結果より、*Fusidium* sp. BX-1 は、油脂類の利用性に関して、酵母類よりも糸状菌類に近い性質を示した。

Table 3 Comparison of growth between *Fusidium* sp. BX-1 and various fungi grown in a medium containing olive oil or oleic acid as a carbon source

Strains	Olive oil		Oleic acid	
	Growth (g dry wt./ml)	Final pH*	Growth (g dry wt./ml)	Final pH*
<i>Fusidium</i> sp. BX-1	21.3	5.6	15.7	5.7
<i>Aspergillus niger</i>	20.9	4.3	18.2	3.1
<i>Penicillium brasilianum</i>	20.4	5.1	18.1	5.0
<i>Rhizopus harachao</i>	17.9	5.0	19.2	4.3
<i>Lepista nuda</i>	20.1	3.9	20.0	3.9
<i>Coprinus cinereus</i>	24.3	5.9	21.0	4.8
<i>Mycena chlorophos</i>	21.8	5.7	21.6	4.1

The organisms were incubated for 4 days.

* : Initial pH 5.0.

5) *Fusidium* sp. BX-1によるリパーゼの生産

これまでに述べてきたように*Fusidium* sp. BX-1は、油脂類の資化性に優れていることから、リパーゼの生産性が高いことが予測された。そこで、BX-1株について、リパーゼの生産性について予備的な検討を加えた。

*Rhizopus*や*Geotrichum*によるリパーゼの生産において見られるように⁷⁾、生産培地における窒素源の種類や濃度が酵素の生産量に大きく影響することから、BX-1株についても、酵素の生産に及ぼす窒素源の影響について調べてみた。

炭素源としてオリーブ油を2%含む基本培地に、窒素源として酵母エキス（オリエンタル酵母）、ポリペプトン（和光純薬）、ポリペプトンS（和光純薬）、コーンステープリカー（Sigma）、乾燥ブイヨン（日水製薬）をそれぞれ1%と5%の濃度になるように加えたものを用いて、BX-1株の生育度と培養液中のリパーゼの活性を測定した（Table 4）。BX-1株は、5%ポリペプトン培地での5日間培養、5%コーンステープリカー培地での3日間培養において、最大の約3U/mlのリパーゼを生産した。調べた条件の中には、生育が良好であってもリパーゼの生産性の低いものもあった。通常のBX-1株の培養に用いる場合と比較して、かなり高い濃度で窒素源が加えられているためか、全体的に培養液のpHが高くなる傾向を示した。

Table 4 Effect of nitrogen sources on production of lipase by *Fusidium* sp. BX-1 in a olive oil medium

Nitrogen source	3 days-culture			5 days-culture		
	Growth (O.D. 610 nm)	Final pH*	Lipase activity (U/ml)	Growth (O.D. 610 nm)	Final pH*	Lipase activity (U/ml)
Yeast extract (0.5%)	25.2	6.9	ND	54.0	5.5	0.37
Yeast extract (1.0%)	27.8	8.7	ND	57.3	7.9	1.0
Yeast extract (5.0%)	37.6	7.9	ND	26.6	7.4	ND
Polypepton (1.0%)	41.0	5.5	1.4	17.0	7.5	1.5
Polypepton (5.0%)	40.0	6.6	0.93	38.9	7.1	3.0
Polypepton S (1.0%)	20.3	7.0	0.50	74.7	4.6	0.75
Polypepton S (5.0%)	49.9	8.0	0.25	44.9	7.3	0.50
Corn steep liquor (1.0%)	48.2	5.9	1.1	43.9	6.6	1.3
Corn steep liquor (5.0%)	51.2	5.9	3.1	52.6	6.0	1.0
Dried bouillon (1.0%)	13.1	7.6	ND	18.3	7.1	1.3
Dried bouillon (5.0%)	14.3	7.9	ND	46.8	7.1	ND

The organism was incubated for 3 or 5 days.

* : Initial pH 5.0.

ND : Not detectable.

以上のように*Fusidium* sp. BX-1は、他の菌類と比較しても、各種の油脂類の利用性がかなり優れていることがわかった。BX-1株はリパーゼを培養液中に生産したがその量は、これまでに知られているリパーゼ生産菌の生産量と比較するとかなり少ないものであった。油脂類を資化できる微生物が、リパーゼを必ずしも大量生産する訳ではないことは周知のところであり、BX-1株がこのようなタイプの微生物であっても不思議でない。リパーゼの基質は水に溶解しないため、その酵素反応は不均一系で行われるため反応の速度論的解析が困難である。今回、本研究では酵素の活性測定に、装置の簡便な乳化系測定法⁸⁾を用いた。しかしながら、*Rhizopus*のリパーゼの活性は、乳化系測定法では非乳化系測定法⁹⁾の1/4の低い値を示すといわれている。これとは逆に、*Candida*由来の市販のリパーゼは非乳化系測定法での値が乳化系測定法の約1/3であるという結果も報告されている¹⁰⁾。

油脂類の微生物による利用に関する研究は、初めにも述べたようにこれまでに多数報告されているが、オリーブ油等のトリグリセリド利用時における微生物の生理化学に関連した報告は少ない。*Fusidium* sp. BX-1は、現時点では必ずしもリパーゼの生産性に優れているとはいえない。BX-1株のリパーゼについても今後、培養条件のみならず酵素活性の測定法について等の検討をして、生産性について評価する必要がある。また、本菌はオリーブ油とそれが分解されて生じるオレイン酸、グリセロールの利用性に優れており、それぞれを単独に利用しているとき、その細胞はグリセロールで酵母状、オリーブ油やオレイン酸では菌糸状と形態変化を示し、細胞外に分泌生産されるデンプン分解酵素やキシラン分解酵素の生産量が著しく変化するという特異な性質を示す。リパーゼの生産性と関連させてこれらの油脂利用時における特性にさらに検討を加えることは、微生物生理化学、細胞形態学の面から興味ある知見が得られるものと思う。

4. 要 約

不完全菌*Fusidium* sp. BX-1の油脂類の利用性とリパーゼ生産性に関して検討した。

BX-1株は広い範囲の油脂類を利用することができ、本菌のオリーブ油の利用性について酵母類や糸状性菌類と比較したところ、本菌の利用性は、酵母より糸状菌に近いことが明らかになった。BX-1株は、オレイン酸を炭素源として培養した場合には直ちに旺盛な生育を示したが、オリーブ油を炭素源として培養した場合には、生育の立ち上がらない誘導期があったのち、オレイン酸培地におけるより早い速度で増殖を始めた。このオリーブ油培地において、BX-1株はリパーゼを細胞外に生産したが、その生産量(約3U/ml)は、既知のリパーゼ生産菌と比較してかなり低いものであった。

本研究を遂行するにあたり、実験に協力下さった千葉大学藤井一太氏にお礼申し上げます。
また、実験協力やご助言を下された千葉大学藤井貴明教授、篠山浩文助教授に深謝いたします。

引用文献

- 1) 藤井貴明、大野信子、内山 茂、宋 淑、篠山浩文、安藤昭一：醸酵工学、69、319 (1991)
- 2) N. Ohono, T. Ijuin, S. Song, S. Uchiyama, H. Shinoyama, A. Ando and T. Fujii: *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56, 465 (1992)
- 3) 大野信子、藤原佳奈、篠山浩文、藤井貴明：生物工学、72、13 (1994)
- 4) 大野信子、伊集院妙子、御園光信：和洋女子大学紀要、第34集(家政系編) 1 (1994)
- 5) 大野信子、仁平佳奈、篠山浩文、藤井貴明：応用糖質科学、43、195 (1996)
- 6) 町田晴夫：微生物の分離法、(山里一英、宇田川俊一、児玉徹、森地敏樹)、pp. 693-696、R&D プラニング、東京 (1986)
- 7) 岩井三枝子：リパーゼ その基礎と応用、幸書房、東京 (1991)
- 8) 仲恭寛：油化学、36、821 (1987)
- 9) 岩井三枝子：科学と工業、43、577 (1969)
- 10) 岩井三枝子：科学と工業、52、93 (1978)

大 野 信 子 (本 学 教 授)

松 野 雅 子 (本 学 卒 業 生)